云 南 植 物 研 究 2004，26（1）：111～117
Acta Botanica Yunnanica

氯化钙浸种对玉米幼苗抗逆性的影响及其与谷胱甘肽还原酶的关系*

郭丽红[1]，陈善娜[1]，龚 明[2**]
（1 云南大学生命科学学院，云南 昆明 650091；2 云南师范大学生命科学学院，云南 昆明 650092）

摘要：两个抗逆性不同的玉米品种经过 $CaCl_2$ 浸种处理后，能显著提高其幼苗在低温、高温、干旱和盐胁迫下的存活率；相反，Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 浸种处理会降低玉米幼苗在上述逆境胁迫下的存活率，表明外源 Ca^{2+} 处理能增强玉米幼苗对低温、高温、干旱和盐胁迫的多重抗逆性。此外，Ca^{2+} 浸种处理能使玉米幼苗在多种逆境胁迫下保持相对较高的谷胱甘肽还原酶（GR）活性，而 EGTA 处理正好相反，表明 GR 可能参与了 Ca^{2+} 提高的玉米幼苗多重抗逆性的调控。

关键词：Ca^{2+}；EGTA；抗逆性；谷胱甘肽还原酶；玉米幼苗
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700(2004)01－0111－07

Effect of Calcium on Multi-resistance in Maize Seedling in Relation to Glutathione Reductase*

GUO Li-Hong[1]，CHEN Shan-Na[1]，GONG Ming[2**]
（1 *School of Life Sciences*，*Yunnan University*，Kunming 650091，China；
2 *School of Life Sciences*，*Yunnan Normal University*，Kunming 650092，China）

Abstract：Pretreatment of maize（*Zea mays* L.，Qing No.3 and Da Huang）seeds with $CaCl_2$ solution could increase survival rate of maize seedlings under chilling，heat，drought and salt stress. In contrast to this，pretreatment with the Ca^{2+}-chelator EGTA decreased survival rate of the seedlings under these stresses. The results demonstrated that the exogenous Ca^{2+} can improve maize seedlings multi-resistance mentioned above. In addition，Ca^{2+} treatment of the seeds enabled the seedlings to keep relatively higher activity of glutathione reductase（GR）than that of Ca^{2+}-deficient treatment（control）. EGTA treatment of the seeds led to more less of GR activity in the seedlings under these stress. It is obvious that GR is involved in the Ca^{2+}-enhanced the mutli-resistance or the stress tolerances of the maize seedlings.

Key words：Ca^{2+}；EGTA；Stress tolerance；Glutathione reductase；Maize seedling

---

* **基金项目**：国家自然科学基金（39860007）、云南省自然科学基金重点项目（98C002Z）及教育部高校优秀青年教师教学科研奖励计划资助
** **通讯作者** E－mail：gongmin@public.km.yn.cn Tel：0871－5516244
收稿日期：2003－06－04，2003－07－21 接受发表
作者简介：郭丽红（1971－）女，硕士，副教授，主要从事植物生理生化及分子生物学研究，现在昆明师专生物系工作。

Ca^{2+} 作为植物细胞中主要信使受到广泛关注（孙大业等，1998)。环境变化能通过改变胞内 Ca^{2+} 水平而将胞外信号转导成胞内生理生化反应（龚明等，1990；Bush，1995；Webb 等，1996)。许多逆境胁迫如高温、低温、机械胁迫、氧化胁迫、缺氧胁迫、低渗胁迫和盐渍等都可引发胞内游离 Ca^{2+} 水平的迅速上升（Lynch 等，1989；Knight 等，1996；Bush，1996；Takahashi 等，1997；Gong 等，1998)。阻碍逆境锻炼过程中 Ca^{2+} 水平上升将阻断植物抗逆性的形成，而人为增加细胞内 Ca^{2+} 水平可诱发抗性相关基因的表达及提高植物的抗逆性（龚明和杨兴富，1994；Gong 等，1996；Gong 等，1997a；Sanders 等，1999；Bowler 等，2000)。这些研究表明以 Ca^{2+} 为核心的钙信使系统可能在植物对逆境胁迫的感受和适应中起中心作用，从而来调节植物对环境胁迫的适应过程。

由于 Ca^{2+} 在植物抗逆性中的重要作用，已有不少研究证实外源 Ca^{2+} 处理可改进植物在逆境胁迫下的生长状况，减轻胁迫伤害及提高植物的抗逆性，如抗冷性（宋广运和陈惠民，1986)，抗冻性（Arora & Palta，1989)，抗热性（Gong 等，1997a，1997b，1998)，抗旱性（龚明等，1996)，抗盐性（Rengel，1992；龚明和和杨兴富，1994)，抗重金属离子胁迫（Zhao 等，1987；Heikal 等，1989）等。但上述研究均只针对 Ca^{2+} 提高植物某种单一的抗性，目前国内外尚未见到外源 Ca^{2+} 处理对植物多种抗逆性影响的研究报道。

本文研究外源钙及 Ca^{2+} 专一螯合剂 EGTA 处理对玉米幼苗抗冷、抗热、抗旱及抗盐性的效应，以及谷胱甘肽还原酶在 Ca^{2+} 对玉米幼苗抗逆性调控中的作用，试图为揭示钙信使系统、抗氧化系统与植物抗逆性的关系提供一些证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植物材料为玉米（*Zea mays*)，品种为晴 3 和大黄。挑选饱满的种子，经 0.1% $HgCl_2$ 消毒 10 min 后，用蒸馏水冲洗干净，以蒸馏水（dH_2O，对照)，20 mmol/L $CaCl_2$ 或 5 mmol/L EGTA 于 25℃下浸种 12 h，然后转移到垫有 6 层湿润滤纸的白磁盘中，于 28℃/25℃（昼/夜）下暗萌发 60 h，每天补充蒸馏水，以保持滤纸的湿润。挑选生长均匀的玉米幼苗转移到下述各种逆境胁迫中。

1.2 胁迫处理及存活率的统计

高温胁迫：50℃ 16 h（晴 3）或 10 h（大黄)；低温胁迫：0.5℃ 5 d（晴 3）或 4 d（大黄)；干旱胁迫：转入干滤纸 4 d；盐渍胁迫：在 700 mmol/L NaCl 下 5 d；处理后的幼苗于 28℃/25℃（昼/夜）下恢复 8 d，每天光照 12 h 及补充适量的蒸馏水，计算存活率。

1.3 谷胱甘肽还原酶（GR，EC.1.6.4.2）活性的测定

GR 的提取与测定基本上按 Knörzer 等（1996）方法并作一些改进（郭丽红等，2002)。蛋白质含量测定采用 Bradford（1976）的方法，以牛血清蛋白为标准。

上述所有实验重复两次，每次实验中有两个取样重复和 6 次测定重复。图中所有数据均为平均值 ± 标准误。

NADPH、NADP、GSSG、GSH 等购自 Sigma 公司。

2 研究结果

2.1 Ca^{2+} 或 EGTA 浸种处理对玉米幼苗抗热、抗冷、抗旱和抗盐性的影响

在本研究中，玉米种子经过 $CaCl_2$、EGTA、dH_2O 浸种，暗萌发 60 h 后，分别置于 50℃

16 h（晴 3）或 10 h（大黄）、0.5℃ 5 d（晴 3）或 4 d（大黄）、干滤纸 4 d、700 mmol·L^{-1} NaCl 下 5 d，发现不同浸种方式的玉米幼苗在不同逆境下的存活率存在着明显差异。图 1 所示，在高温胁迫（图 1，A）、低温胁迫（图 1，B）、干旱胁迫（图 1，C）和盐胁迫（图 1，D）下，无论晴 3 还是大黄，$CaCl_2$ 浸种的玉米幼苗存活率最高，而 dH_2O 浸种的次之，EGTA 浸种的玉米幼苗存活率最低。$CaCl_2$ 和 EGTA 对晴 3 抗逆性的影响程度比大黄的大。从外观看，未经钙处理的玉米种子长出的幼苗，在热胁迫下，幼苗中胚轴出现褐化现象，有的甚至枯萎；在冷胁迫下，玉米幼苗中胚轴出现水渍状，在回温后幼苗死亡；在干旱环境中，玉米幼苗失水严重，出现倒伏现象；在盐胁迫下，幼苗根系腐烂，生长受抑，直至死亡。而经钙浸种处理的玉米幼苗，尽管也有伤害，但外观的伤害程度和死亡率都明显低于未经钙浸种的对照幼苗。相反地，EGTA 浸种处理的玉米幼苗，其外观的伤害程度和死亡率都明显高于未经钙浸种的对照幼苗（结果未显示）。这些结果表明外源 Ca^{2+} 能提高玉米幼苗的抗热、抗冷、抗旱和抗盐性，而外源 EGTA 则降低玉米幼苗的抗热、抗冷、抗旱和抗盐性。

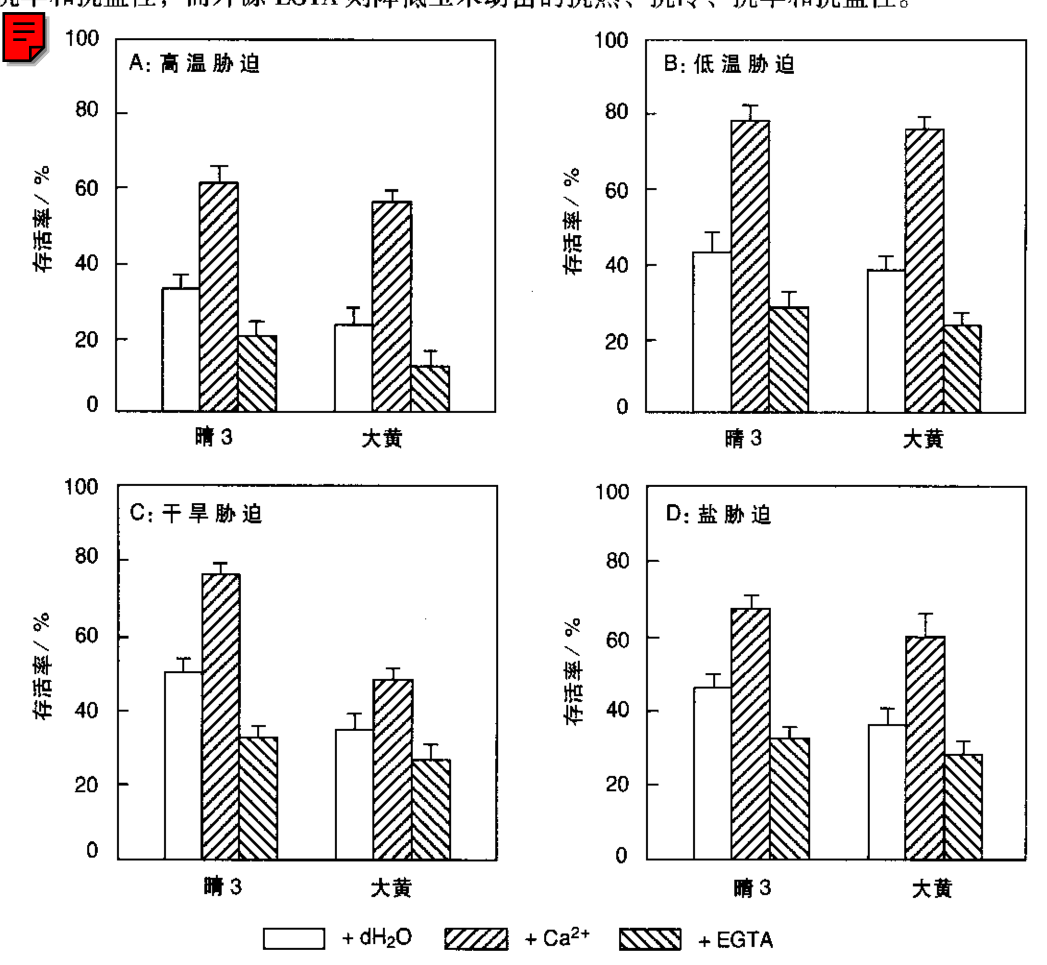


图 1　外源 Ca^{2+} 及 EGTA 处理对玉米幼苗抗热、抗冷、抗旱和抗盐性的影响

Fig. 1　Effect of exogenous Ca^{2+} and EGTA treatment on heat, cold, drought and salt resistance in maize seedling

2.2 Ca^{2+}或EGTA浸种处理对高温、低温、干旱、盐渍胁迫下玉米幼苗GR活性的影响

GR在植物对多种逆境胁迫的适应中起重要的作用（Mullineaux & Creissen，1997）。在本研究中，不同的浸种方式不仅对玉米幼苗的抗热、抗冷、抗旱和抗盐性的影响不同，而且对GR酶活性的影响也不同。从图2可知，对于晴3幼苗，在高温（图2，A）、低温（图2，B）、干旱（图2，C）和盐胁迫（图2，D）下，无论哪一种浸种方式，玉米幼苗在胁迫初期的GR活性都有一轻微的下降，而随着胁迫时间的延长，GR酶活性逐步上升，并达到一个高峰。在胁迫后期，酶活性又急剧下降至较低水平。从整个过程来看，无论是哪一时期，$CaCl_2$、EGTA和dH_2O浸种的玉米幼苗GR变化是平行的，即$CaCl_2$浸种的玉米幼苗GR酶活性最高，dH_2O浸种的次之，EGTA浸种的GR酶活性最低。对于大黄幼苗，如图3，其变化与晴3基本相同，即不同浸种处理的GR酶在高温（图3，A）、低温（图3，B）、干旱（图3，C）和盐胁迫（图3，D）下活性的高低依次是$CaCl_2$、dH_2O和EGTA浸种处理的。

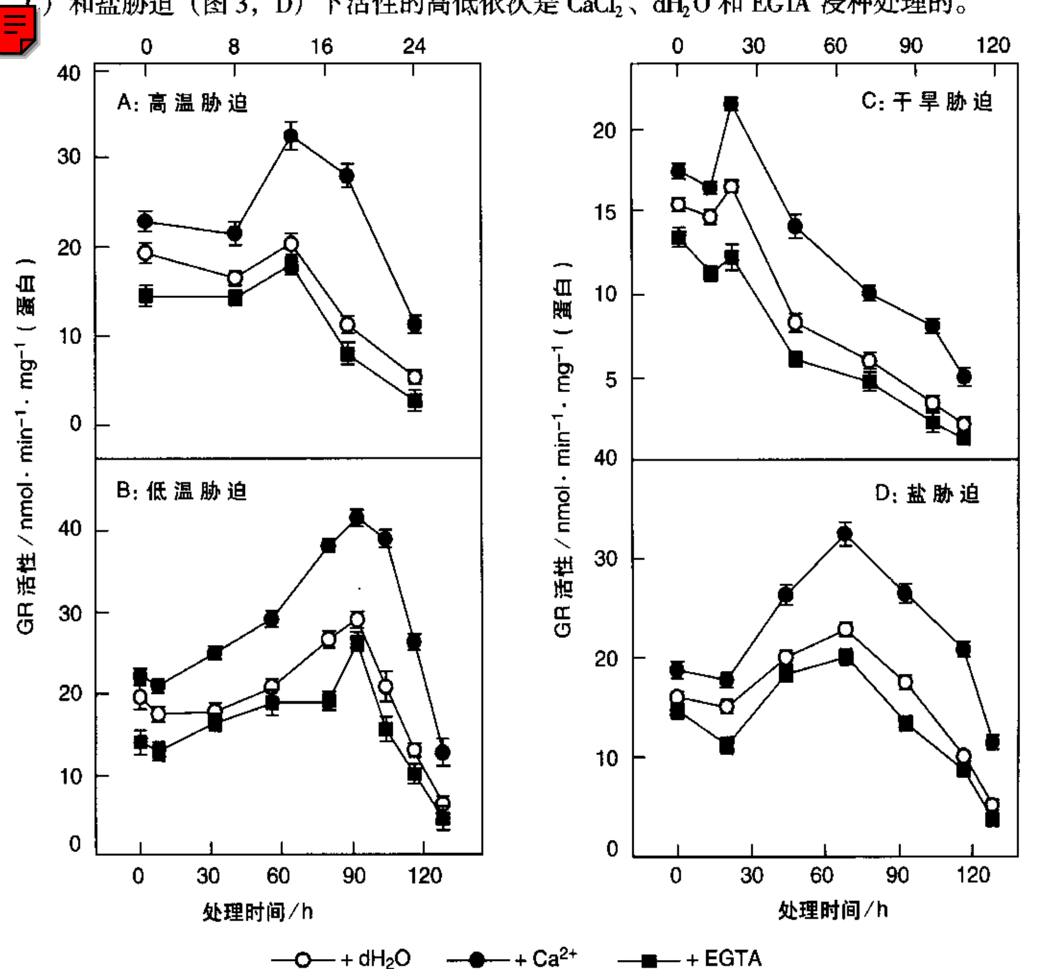


图2 Ca^{2+}及EGTA浸种处理对高温、低温、干旱、盐胁迫中的玉米（晴3）幼苗GR活性变化的影响

Fig. 2 Effect of exogenous Ca^{2+} and EGTA treatment on glutathione reductase activity during heat, chilling, drought and salt stress in maize (Qing 3) seedling

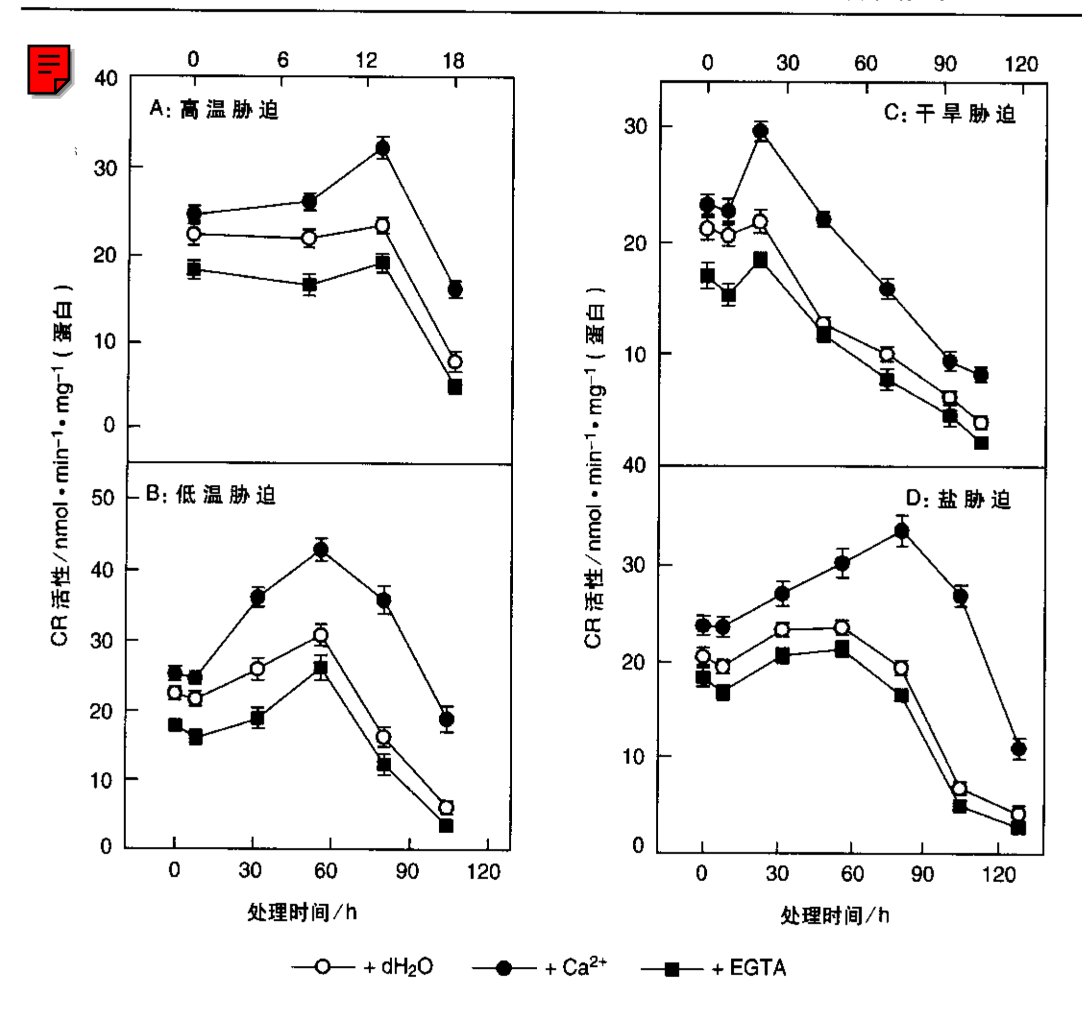


图3　Ca^{2+} 及 EGTA 浸种处理对高温、低温、干旱、盐胁迫中的玉米（大黄）幼苗 GR 活性变化的影响

Fig. 3　Effect of exogenous Ca^{2+} and EGTA treatment on glutathione reductase activity during heat, chilling, drought and salt stress in maize (Dahuang) seedling

3　讨论

Ca^{2+} 不仅作为植物必需营养元素，而且具有稳定膜结构的功能及作为某些酶分子的结构“稳定剂”，同时，Ca^{2+} 作为第二信使在植物体对外界信号的感应，传递和响应过程中起着重要作用（龚明等，1990；Bush，1995；Webb 等，1996；Sanders 等，1999）。通常细胞质基质中［Ca^{2+}］低而胞外、细胞器中浓度高，约相差 10^3 ~ 10^4 数量级，故胞外 Ca^{2+} 的进入及细胞器中 Ca^{2+} 的释放均能引起胞质中［Ca^{2+}］的较大升高，当达阈值时 Ca^{2+} 与 CaM 形成 Ca-CaM 复合物，此复合物作用于靶酶或引发蛋白质磷酸化等激活某些酶类，最终启动各种生理生化适应机制（龚明等，1990；Bush，1995；Webb 等，1996；Sanders 等，1999）。若 Ca^{2+} 缺少及受到特异性抑制时，则此信号不能传递，植物体适应机制不能启动。在本研究中，玉米种子经过 $CaCl_2$、Ca^{2+} 专一螯合剂 EGTA 浸种，两种抗逆性不同的玉米幼苗在高温、低温、干旱、盐渍胁迫下，均表现为 $CaCl_2$ 浸种的玉米幼苗存活率增高，

EGTA浸种的玉米幼苗存活率降低（图1）。由于预先用$CaCl_2$浸种，Ca^{2+}进入细胞间隙，大大提高了玉米种子胞外Ca^{2+}含量，此时种子代谢活动弱，细胞处于“钝化”状态，尽管外界存在高浓度Ca^{2+}，但难于扩散或主动运输进入胞内，仅与膜相互作用，提高膜稳定性，为逆境胁迫下抵抗膜伤害做准备。当玉米种子萌发后，因活细胞内外巨大的电化学梯度，Ca^{2+}被动扩散入细胞，同时利用代谢活动加强后提供的充足能量主动进入。因此与对照组相比，正是由于通过增加外源Ca来提高胞内Ca^{2+}水平，使之更为接近阈值，一旦高温、低温、干旱、盐渍信号被感知，引发整个与Ca^{2+}-CaM相偶联的生理生化机制，使细胞及早启动逆境适应机制，尽量避免或减轻伤害。而未经$CaCl_2$浸种的玉米幼苗与之相反，或因Ca^{2+}水平升高缓慢造成抗性机制启动过晚，或因胁迫强度过大，膜结合Ca^{2+}大量脱离和胞内游离Ca^{2+}增加过多，直接造成膜结构损伤和细胞内Ca^{2+}毒害而引起细胞内生理生化过程紊乱，导致伤害发生。EGTA浸种对玉米幼苗所产生的效应也从另一个角度证实了胞内Ca^{2+}水平的变化对植物抗逆性的影响。EGTA并不能进入胞内作用，但它能螯合胞外Ca^{2+}，使胞内Ca^{2+}及细胞间隙Ca^{2+}减少，并随其浓度的升高螯合程度加大，不仅造成膜缺少Ca^{2+}的保护作用，而且影响了胞外反应，逆境信号不能及时传递，使反应“迟钝”，适应机制不能及时启动，从而抗逆性降低，不能很好适应逆境。外源Ca^{2+}能提高玉米幼苗的抗热、抗冷、抗旱和抗盐性，而EGTA则降低玉米幼苗的抗热、抗冷、抗旱和抗盐性，证实了Ca^{2+}对植物的抗逆性具有调控作用。

已知各种逆境胁迫都可诱发细胞内活性氧浓度的增加而导致氧化胁迫，植物抗逆性的最终形成常常与抗氧化酶系统活性的增加密切相关（Alscher等，1997；Knörzer等，1996；Smirnoff，1995）。GR在植物的逆境胁迫适应中尤其起着重要作用（Mullineaux & Creissen，1997）。本研究发现Ca^{2+}对高温、低温、干旱、盐胁迫中的抗氧化酶GR活性变化的影响是类似的。从图2和图3可知，尽管逆境胁迫使GR活性发生变化，即在胁迫初期活性氧浓度增加，抗氧化酶系统积极参与，GR活性增加，但胁迫时间延长，使酶受到逆境伤害，以致GR活性在胁迫后期迅速降至比处理前基础低的水平，但无论是哪一时期，经过$CaCl_2$浸种的玉米幼苗中GR酶活性增高，而Ca^{2+}专一螯合剂EGTA浸种的GR酶活性降低。这表明Ca^{2+}对玉米幼苗体内GR酶有激活效应，EGTA通过结合Ca^{2+}，而使GR酶活性降低，正如我们最近在离体GR酶上得到的结果一样（郭丽红等，2002）。由于Ca^{2+}可明显提高玉米幼苗的抗热、抗冷、抗旱和抗盐性，而玉米幼苗的抗逆性与GR酶活性变化相一致。因此，我们认为Ca^{2+}处理提高抗氧化酶GR活性可能是Ca^{2+}处理增强玉米幼苗多种抗逆性的途径之一。

〔参 考 文 献〕

孙大业，郭艳林，马力耕，1998．细胞信号传导［M］．北京：科学出版社，175—177

宋广运，陈惠民，1986．钙对棉花胚根抗冷性的影响［J］．中国农业科学，**2**：23—25

龚明，李英，曹宗巽，1990．植物体内的钙信使系统［J］．植物学通报，**7**（3）：19—29

Alscher RG，Donahue JL，Cramer CL，1997．Reactive oxygen species and antioxidants：relationships in green cells［J］．*Physiologia Plantarum*，**100**：224—233

Arora R，Palta JP，1989. Perturbation of membrane calcium as a molecular mechanism of freezing injury [A]. In：Cherry JH，Environmental Stress in Plant [M]. Berlin：Springer-Verlag，281—290

Bowler C，Fluhr R，2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-adaptation [J]. *Trends in Plant Sci*，**5**：241—246

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microdram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye-binding [J]. *Analyt Biochem*，**44**：276—287

Bush DS，1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*，**46**：95—122

Bush DS，1996. Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells [J]. *Planta*，**199**：89—99

Gong M（龚明），Yang ZH（杨兴富），1994. Effect of calcium on salt resistance in maize seedlings [J]. *Plant Physiol Commun*（植物生理学通讯），**30**（6）：429—432

Gong M（龚明），Du CK（杜朝昆），Xu WZ（许文忠），1996. Involvement of calcium and calmodulin in the regulation of dought resistance in *Zea mays* seedlings [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*（西北植物学报），**16**（3）：214—220

Gong M，Chen SN，SongY Q，*et al*，1997a. Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings [J]. *Australian Journal of Plant Physiology*，**24**：371—379

Gong M，Li YJ，Dai X，*et al*，1997b. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize seedlings [J]. *J Plant Physiology*，**150**：615—621

Gong M，van der Luit AH，Knight MR，*et al*，1998. Heat shock-induced changes of intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance [J]. *Plant Physiol*，**116**：429—437

Guo LH（郭丽红），Chen SN（陈善娜），Gong M（龚明），2002. Effect of calcium on glutathione reducase of maize seedlings [J]. *Plant Physiol Commun*（植物生理学通讯），**38**（2）：115—117

Heikal MMD，Berry WL，Wallace A，*et al*，1989. Alleviation of nickel toxicity by calcium salinity [J]. *Soil Science*，**147**：143—415

Knörzer OC，Durner J，Böger P，1996. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells（*Glycine max*）induced by oxidative stress [J]. *Physiologia Plantarum*，**97**：388—396

Knight H，Trewavas AJ，Knight MR，1996. Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation [J]. *Plant Cell*，**8**：489—503

Lynch J，Polito VS，Lauchli A，1989. Salinity stress increases cytoplasmic Ca^{2+} activity in maize root protoplasts [J]. *Plant Physiology*，**90**：1271—1274

Mullineaux PM，Creissen GP，1997. Glutathione reductase：Regulation and role in oxidative stress [A]. In：Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses [M]. United Kingdom：Cold Spring Harbor Laboratory Press，667—712

Rengel Z，1992. The role of calcium in salt toxicity [J]. *Plant Cell and Environment*，**43**：375—414

Sanders D，Brownlee C，Harper JF，1999. Communicating with calcium [J]. *The Plant Cell*，**11**：691—706

Smirnoff N，1995. Antioxidant systems and plant response to the environment [A]. In：Smirnoff N，eds. Environment and Plant Metabolism：Flexibility and Acclimation [M]. Oxford：Bios Scientific Publishers，217—243

Takahashi K，Isobe M，Knight MR，*et al*，1997. Hypo-osmotic shock induces increases in cytosolic Ca^{2+} in tobacco suspension-culture cells [J]. *Plant Physiology*，**113**：587—594

Webb AAR，Mcainsh MR，Taylor JE，*et al*，1996. Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants [J]. *Advances in Botanical Research*，**22**：45—96

Zhao XJ，Sucoff E，Stadelmann EJ，1987. Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells [J]. *Plant Physiology*，**83**：159—162